

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
24. April 2003 (24.04.2003)

PCT

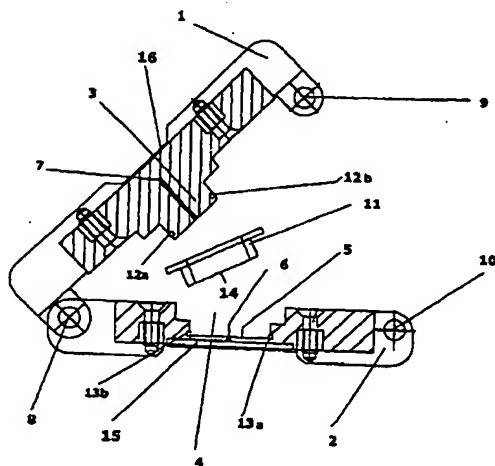
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/033642 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12M 3/04 (71) Anmelder und
(72) Erfinder: WAGNER, Edgar [DE/DE]; Am Bergwerk 14,
79283 Bollschweil (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/11346
- (22) Internationales Anmeldedatum: 10. Oktober 2002 (10.10.2002) (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BECK, Christoph
[DE/DE]; Schlierbergweg 108, 79100 Freiburg (DE).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch (74) Anwalt: GILLE HRABAL STRUCK NEIDLEIN
PROP ROOS; Brucknerstrasse 20, D-40593 Düsseldorf
(DE).
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 101 50 269.9 11. Oktober 2001 (11.10.2001) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROCHAMBER

(54) Bezeichnung: MIKROKAMMER



(57) Abstract: A microchamber for carrying out non-invasive measurements, cultivation and/or manipulation of biological materials is disclosed, comprising a housing (1, 2), made from an upper piece (1) and a lower piece (2) with a receptacle-shaped recess (4, 5) in the lower piece (2) and a protuberance (3) on the upper piece (1), with at least one liquid- and gas-supplying supply and drain line (6, 7) in the receptacle-shaped recess (4, 5). The upper piece (1) is embodied such as to pivot relative to the lower piece (2), by means of a joint (8), whereby the projection of the upper piece (3) and the receptacle-shaped recess (4, 5) in the lower piece are so arranged and embodied that, in a closed position of lower piece (2) and upper piece (1), the receptacle-shaped recess (4, 5) of the lower piece is sealed by the projection on the upper piece (3) in the manner of a lid to form a first chamber (5) and a locking means (9, 10) is provided to secure the closed position. The invention also relates to the use of said microchamber for the cultivation, manipulation and/or carrying out of non-invasive measurements on biological material.

(57) Zusammenfassung: Es wird eine Mikrokammer zur Durchführung nicht-invasiver Messungen, Kultivierung und / oder Manipulation an biologischem Material beschrieben mit einem Gehäuse (1, 2) aus einem Oberteil (1) und einem Unterteil (2), mit einer behälterförmigen Ausnehmung (4, 5) im Unterteil (2) und einer Ausstülpung (3) im Oberteil (1), mit wenigstens jeweils einer Flüssigkeits- oder

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 03/033642 A2



CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

SE, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

gasführenden Zu- und Ableitung (6, 7) in die behälterförmige Ausnehmung (4, 5), wobei das Oberteil (1) gegenüber dem Unterteil (2) mit einem Gelenk (8) klappbar ausgestaltet ist, wobei die Ausstülpung des Oberteils (3) und die behälterförmige Ausnehmung (4, 5) des Unterteils so angeordnet und ausgestaltet sind, dass in einer zugeklappten Position von Unterteil (2) und Oberteil (1) die behälterförmige Ausnehmung (4, 5) des Unterteils, eine erste Kammer (5) bildend, deckelartig durch die Ausstülpung des Oberteils (3) abgedichtet ist, wobei ein Verschlussmittel (9, 10) zur Sicherung der zugeklappten Position vorgesehen ist, sowie die Verwendung dieser Mikrokammer zur Kultivierung, Manipulation und / oder Durchführung nicht-invasiver Messungen an biologischem Material.

Mikrokammer

Die Erfindung betrifft eine Mikrokammer und deren Verwendung.

Stand der Technik

Es existiert bereits eine Reihe von Bioreaktoren zur Durchführung von Messungen an biologischem Material, insbesondere zur Untersuchung von Stoffwechselprozessen oder zur Durchführung toxikologischer Untersuchungen, z.B. an Wasser- oder Luftproben.

Als Beispiele können genannt werden miniPERM der Firma IN VITRO Systems & Services, ein Mini-Festbett-Bioreaktor der Firma Meredos, ein Flüssigbettreaktor des Forschungszentrum Jülich, BIACORE X der Firma BIACORE, cellferm-pro der Firma DASGIP mbH, Cytosensor® der Firma Molecular Devices, FLEXERCELL® der Firma Flexcell, Suprafusion der Firma Brandel, Vertical Schuler Organ Bath der Firma HSE Harvard, das Rotary Cell culture system von Synthecon, der Wave Bioreactor Cellbase der WaveBiotech AG, sowie Kammern der Firma cell-lining. Die meisten dieser Reaktoren bzw. Systeme sind nur für große Volumina im ml- bis l-Maßstab geeignet. DE 44 43 902 offenbart eine Mikroskopkammer mit speziell angeordneten Dichtungen zur optischen Untersuchung von Stoffwechselvorgängen an Zellen, und die Firma Minucells and Minutissue Vertriebs GmbH bietet entsprechende Gradientenkulturrkammern an

Die genannten Kammern bzw. Reaktoren weisen Nachteile dahingehend auf, dass jeweils große Probenmengen bzw. große Mengen an teuren Reagenzien wie Hormonen und Membraneffektoren erforderlich sind.

Eine Aufgabe der Erfindung bestand daher darin, eine für Arbeiten im Mikroliter-Maßstab geeignete Kammer bereitzustellen, deren Volumen zusätzlich variabel wählbar sein sollte. Zudem bestand ein Bedarf an einer flexibel verwendbaren Kammer, in die das biologische Material an unterschiedlichen Positionen eingebracht werden kann, die zudem je nach Bedarf als 1-Kammer- oder 2-Kammer-System betrieben werden kann, um Untersuchungen mit Kulturmedien- oder Reagenz-Gradienten durchführen zu können, und in die verschiedenste Messsensor-Systeme an unterschiedlichen Positionen eingebracht werden können, d.h. an einer vielseitig und einfach flexibel zu handhabenden Kammer.

Die Aufgabe wurde gelöst durch die in Anspruch 1 im Zusammenhang mit der in Figuren 1 bis 4 definierten Mikrokammer. Bevorzugte Ausgestaltungen sind in den Ansprüchen 2 bis 11 definiert. Die Erfindung betrifft weiter die Verwendung der Mikrokammer wie in Anspruch 12 definiert.

Kurze Beschreibung der Figuren

Figuren 1, 2, 3 und 4 stellen zwei Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Kammer dar. In den Figuren sind folgende Bezugszeichen angegeben:

1	Oberteil
2	Unterteil
3	Ausstülpung
4	Behälterförmige Ausnehmung
5	Behälterförmige Ausnehmung bzw. erste Kammer
6	Flüssigkeits- oder gasführende Zu- bzw. Ableitung
7	Flüssigkeits- oder gasführende Zu- bzw. Ableitung
8	Gelenk
9	Verschlussmittel
10	Verschlussmittel
11	Aufsatz

12a, b	Dichtring
13a, b	Dichtring
14	Membran
15	Scheibe bzw. Biosensorträger
16	Sichtöffnung
17	Zweite Kammer

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Die Mikrokammer ist als Perfusionskammer konzipiert und erlaubt Kultivierung, Manipulation und/oder nicht-invasive Messungen an biologischem Material im miniaturisierten Maßstab.

Als biologisches Material können Bakterien, Algen, adhärent wachsende pflanzliche, tierische oder humane Zellen, pflanzliche, tierische oder humane Zellsuspensionen, pflanzliches, tierisches oder humanes Gewebe und pflanzliche oder tierische Kleinorganismen eingesetzt werden.

In der erfindungsgemäßen Kammer weisen die erste und / oder die zweite Kammer (5) bzw. (17) Volumina im Mikroliterbereich auf. Typischerweise betragen die Volumina der Kammer(n) je ca. 10 bis 1000 μl , bevorzugt 100 bis 300 μl , noch bevorzugter 150 bis 250 μl . Die Miniaturisierung des Messsystems ermöglicht die Installation von parallel betriebenen Perfusionskammern für den industriellen Einsatz mit hohem Probendurchsatz. Die Mikrokammer wird als Modul einer Gesamtmessvorrichtung eingesetzt, welche neben der Mikrokammer einen Sensormodul aufweist.

Die Mikrokammer (Durchflusszelle) besteht aus einem unteren (2) und einem oberen Teil (1) (Zellkörper; Gehäuse (1, 2)), die über ein Gelenk (8) miteinander verbunden sind und durch ein Verschlussmittel, bevorzugt einen Schnellverschluß (9, 10) verriegelt werden. Sowohl der untere (2) als auch der obere Zellkörper (1) verfügen über mindestens einen Zulauf und über

mindestens einen Ablauf (6, 7) . Der hydrostatische bzw. barometrische Druck in mindestens einem Zulauf (6, 7) und mindestens einem Ablauf (6, 7) ist monitorierbar und in physiologischen Grenzen regelbar. Im unteren Zellkörper (2) mündet mindestens ein Zulauf (6, 7) und mindestens ein Ablauf (6, 7) in einer behälterförmigen Ausnehmung (4, 5), die nach unten (zur Außenseite des Gehäuses (1, 2)) bevorzugt über eine transparente Fläche oder alternativ über einen planaren Mikrosensorchip (Biochip) abgedichtet ist.

Der Biochip kann aus den bekannten Biosensoren ausgewählt werden und umfasst z.B. auf einen geeigneten scheibenförmigen Träger aufgebrachte Gewebeschnitte, Hirnschnitte, Antikörper, DNA, RNA, Antigene, Moleküle beliebiger Größe und chemischer Zusammensetzung, Zellen, Bakterien, Algen, Viren, Einzelzellschichten usw. Der Biochip kann auch interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES-Sensoren) aufweisen und/oder durch Ringelektroden elektrisch stimulierbar ausgestaltet sein.

Bevorzugt führt mindestens eine den Zulauf und mindestens den Ablauf verbindende Leitung am Probenkompartiment (behälterförmige Ausnehmung (4, 5)) vorbei und dient zur Messung von Nullkontrollen.

Im oberen Zellkörper (1) münden mindestens ein Zulauf (6, 7) und mindestens ein Ablauf (6, 7) in einer Ausstülpung (3), der bevorzugt aus transparentem Material besteht, über den bevorzugt entweder ein Membraneinsatz (11) mit einer hydrophilen, hydrophoben oder semipermeablen Membran oder ein Einsatz (11) ohne Membran gesteckt wird. Das bei Verwendung eines Membraneinsatzes mit Membran (14) entstehende Kompartiment zwischen Membran und Ausstülpung (3) wird bevorzugt über einen Dichtring (12a, 12b) abgedichtet. Bevorzugt führt eine mindestens eine Zuleitung (6, 7) und mindestens eine Ableitung (6, 7) verbindende Leitung am Kompartiment vorbei und dient zur Messung von Nullkontrollen.

Bei Verwendung eines Membraneinsatzes (14) mit Membran entstehen durch das Zusammenführen des, über ein Gelenk (8) verbundenen, oberen (1) und unteren (2) Gehäuses zwischen der Ausstülpung (3) des Oberteils (1) und der Ausnehmung (4, 5) des unteren Zellkörpers zwei Kompartimente (Kammern 5, 17), die durch die bevorzugt semipermeable Membran des Membraneinsatzes (14) getrennt sind.

Die Zu- und Ableitungen (6, 7) münden im Oberteil (1) und im Unterteil (2) bevorzugt etwa in der Mitte der jeweiligen Kammer, um eine gleichmäßige Durchmischung der Inhalte zu gewährleisten

Das Volumen des oberen Kompartiments (zweite Kammer (17)), zwischen Ausstülpung (3) und Membran, wird durch die Höhe der Ausstülpung (3) bestimmt, und kann je nach Anwendung durch Auswechseln der Ausstülpung (3) variiert werden. Das Volumen des unteren Kompartiments (erste Kammer (5)) wird durch die Tiefe der Ausnehmung (4) des Unterteils (2) bestimmt und kann je nach Anwendung durch Auswechseln der Ausnehmung variiert werden.

Da sowohl das Oberteil (1) als auch das Unterteil (2) über jeweils mindestens einen Zulauf (6, 7) und mindestens einen Ablauf (6, 7) verfügen, können beide Teile (1, 2) mit unterschiedlichen wässrigen und / oder gasförmigen Medien und / oder Gemischen beschickt werden. Der hydrostatische bzw. barometrische Druck ist in beiden Kammern durch übliche Maßnahmen einstell- und regelbar.

Bei Verwendung eines Einsatzes (14) ohne Membran entsteht durch das Zusammenführen des, über ein Gelenk (8) verbundenen, oberen und unteren Gehäuses (1, 2) zwischen der Ausstülpung (3) des Oberteils (1) und der Ausnehmung (4) des Unterteils (2) eine zentrale Kammer (Reaktionsraum) (5), deren Volumen durch die Höhe der Ausstülpung bestimmt, und je nach Anwendung variiert werden kann.

Bevorzugt wird die Ausstülpung (3) des Oberteils (1) aus transparentem Material gefertigt und die Ausnehmung (4) des Unterteils (4) nach unten durch ein transparentes Material abgeschlossen. Daher verfügen beide Kammern (5, 17) über jeweils ein optisches bzw. die zentrale Kammer (5) über zwei optische Fenster. Diese Fenster ermöglichen eine Belichtung der Kammer(n) und / oder eine Visualisierung und/oder Prozeßkontrolle über alle gängigen mikrooptischen und/oder spektroskopischen Techniken. Eine entsprechende Ausgestaltung ist in Figuren 1 und 2 dargestellt.

Insbesondere kann die Messung durch Lichtmikroskopie oder confokale Lasermikroskopie erfolgen. Zum Nachweis können ggf. auch Fluoreszenznachweismethoden eingesetzt werden.

Das transparente Material kann beliebig ausgewählt werden, es soll aber im Kontakt mit den verwendeten Medien keine toxischen Produkte wie z.B. Weichmacher abgeben. Z.B. sind transparente Kunststoffe, Quarz oder Glas geeignet.

Die Dichtungsmaterialien werden aus den gängigen ausgewählt und umfassen z.B. Gummi, Silikon oder Teflon.

Durch Bohrungen im Ober- und / oder im Unterteil (1, 2) können bevorzugt in beide Kammern (5, 17) bzw. den zentralen Reaktionsraum (5) zusätzliche Sensoren (z.B. Optoden, Drucksensoren) oder Elektroden (z.B. zur Ableitung elektrischer Signale oder zur elektrischen Stimulation) eingeführt werden. Es können so z.B. Messungen von pH, pO₂, Impedanz, Fluoreszenz, Temperatur etc. durchgeführt werden.

In beide Kammern (5, 17) bzw. die zentrale Kammer (5) kann ein berührungsfrei angetriebener Magnetrührer eingebracht werden.

Die Membran des Einsatzes (14) kann aus üblichem für Membranen verwendetem Material bestehen. Sie kann hydrophil, hydrophob, semipermeabel oder nicht permeabel sein und wird mit geeigneten Verfahren für den jeweiligen Einsatzzweck geeignet vorbehandelt. Die Membran kann auch sandwichartig eingebettetes biologisches Material enthalten, z.B. in einer Alginatmatrix. Die Membran kann mit Monoschichten aus Zellen oder ähnlichem biologischem Material beschichtet sein. Durch unterschiedliche Wahl des hydrostatischen oder barometrischen Drucks in den beiden Kammern (5, 17) kann eine Verformung der auf die Membran aufgebrachten Zellen bewirkt werden.

Durch das Zusammenführen des Oberteils (1) und des Unterteils (2) wird die Ausstülpung (3) schräg in die Ausnehmung (4) des Unterteils (2) eingeführt und dadurch der Einschluß von Luftblasen bei Arbeiten mit wässrigen Medien verhindert. Üblicherweise wird zunächst die erste Kammer (5) befüllt, dann ggf. der Aufsatz (11) auf die Ausstülpung (3) aufgesetzt, die Ausstülpung durch Zusammenführen von Ober- und Unterteil (1, 2) schräg in die erste Kammer (5) eingeführt und dann die zweite Kammer (17) durch die Zuleitungen gefüllt.

Das Gehäuse (1, 2) kann entweder über ein angeschlossenes Wasserbad oder elektrisch über integrierte Peltierelemente oder durch Aufbringen auf eine übliche Heizplatte temperiert (erwärmt oder gekühlt) werden. In diesem Fall besteht das Gehäuse aus wärmeleitendem Material, z.B. Aluminium oder ähnlichem.

Die gesamte Mikrokommer ist sterilisierbar.

An mindestens einem Zulauf (6, 7) und/oder an mindestens einem Ablauf (6, 7) wird mindestens ein Sensormodul angeschlossen, in dem mindestens eine Mikroelektrode zur Messung des durchströmenden Mediums integriert ist. Ein Sensormodul besitzt auf der der Mikrokommer zugewandten Seite jeweils eine

Kanüle, die in einen, jeweils mit einem sterilen Septum verschlossenen, Ablauf der Mikrokammer gestochen wird, und eine sterile Verbindung zwischen Mikrokammer und Sensormodul ermöglicht.

Die Messungen können über kurze oder beliebig lange Zeiträume durchgeführt werden und sind speziesunabhängig. Es können beispielsweise Stoffwechselprozesse einzelner Spezies oder toxikologische Untersuchungen von flüssigen oder gasförmigen Proben durch Verwendung bestimmter Spezies als „Sensor“ durchgeführt werden.

Durch die erfindungsgemäße Kammer wurde erstmals eine Mikrokammer für sehr kleine Volumina im Mikroliterbereich bereitgestellt, die sehr einfach bedienbar und trotz der geringen Größe der Reaktionskammer(n) robust und gut handhabbar ist. Das Volumen der Kammer(n) ist leicht variierbar. Der Aufbau ermöglicht eine äußerst vielseitige Anwendung verschiedenster Untersuchungsmaterialien und Meßmethoden.

Patentansprüche:

1. Mikrokammer zur Kultivierung, Manipulation und/oder nicht-invasiven Messung an biologischem Material, mit einem Gehäuse (1, 2) aus einem Oberteil (1) und einem Unterteil (2), mit einer behälterförmigen Ausnehmung (4, 5) im Unterteil (2) und einer Ausstülpung (3) im Oberteil (1), mit wenigstens jeweils einer flüssigkeits- oder gasführenden Zu- und Ableitung (6, 7) in die behälterförmige Ausnehmung (5), wobei das Oberteil (1) gegenüber dem Unterteil (2) mit einem Gelenk (8) klappbar ausgestaltet ist, wobei die Ausstülpung des Oberteils (3) und die behälterförmige Ausnehmung (4, 5) des Unterteils so angeordnet und ausgestaltet sind, dass in einer zugeklappten Position von Unterteil (2) und Oberteil (1) die behälterförmige Ausnehmung (5) des Unterteils, eine erste Kammer (5) bildend, deckelartig durch die Ausstülpung des Oberteils (3) abgedichtet ist, wobei ein Verschlussmittel (9, 10) zur Sicherung der zugeklappten Position vorgesehen ist.
2. Mikrokammer nach Anspruch 1 mit einer an der behälterförmigen Ausnehmung (4, 5) vorbeiführenden, und / oder mit einer an der Ausstülpung (3) vorbeiführenden, jeweils die Zu- und Ableitung (6, 7) verbindenden flüssigkeit- oder gasführenden Leitung.
3. Mikrokammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit einem Aufsatz (11), welcher auf die Ausstülpung (3) aufsetzbar und in die behälterförmige Ausnehmung (4,5) einsetzbar ist.
4. Mikrokammer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Ausstülpung (3) eine zweite Kammer (17) aufweist, mit wenigstens jeweils einer flüssigkeits- oder gasführenden Zu- und Ableitung in die zweite Kammer (17), wobei die zweite Kammer

- (17) eine Membran (14) zu der Seite aufweist, mit der in der geschlossenen Position die behälterförmige Ausnehmung (4,5), eine erste Kammer (5) bildend, deckelartig verschlossen wird.
5. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit wenigstens einem in die erste (5) und / oder zweite Kammer (17) eingebrachten Biosensor und/oder physikochemischen Sensor.
 6. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste (5) und / oder die zweite Kammer (17) mit Hilfe von Dichtringen (12a, 12b, 13a, 13b) abgedichtet ist bzw. sind.
 7. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche wobei die Zu- bzw. Ableitungen (6, 7) in die erste und / oder zweite Kammer (5, 17) mit gegeneinander austauschbaren unterschiedlichen Anschlussmodulen versehen sind.
 8. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste und / oder zweite Kammer (5, 17) für eine mikrooptische oder spektroskopische Beobachtung wenigstens teilweise durchlässig ausgestaltet sind.
 9. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei diese wenigstens teilweise aus wärmeleitfähigem Material zur Beheizung hergestellt ist.
 10. Mikrokommer nach einem der vorhergehenden Ansprüche mit einem oder mehreren Peltierelementen zur Beheizung bzw. Kühlung.
 11. Mikrokommer nach einem der Ansprüche 3 bis 10, wobei die Membran (14) als eine hydrophobe, hydrophile, semipermeable oder nicht permeable, mit biologischem Material ein- oder zweiseitig beschichtete oder biologisches Material sandwichartig eingebettet enthaltende Membran ausgestaltet ist.

12. Verwendung einer Mikrokammer nach einem der vorstehenden Ansprüche zur Kultivierung, Manipulation und/oder nicht-invasiven Messung an biologischem Material in miniaturisiertem Maßstab.

1/4

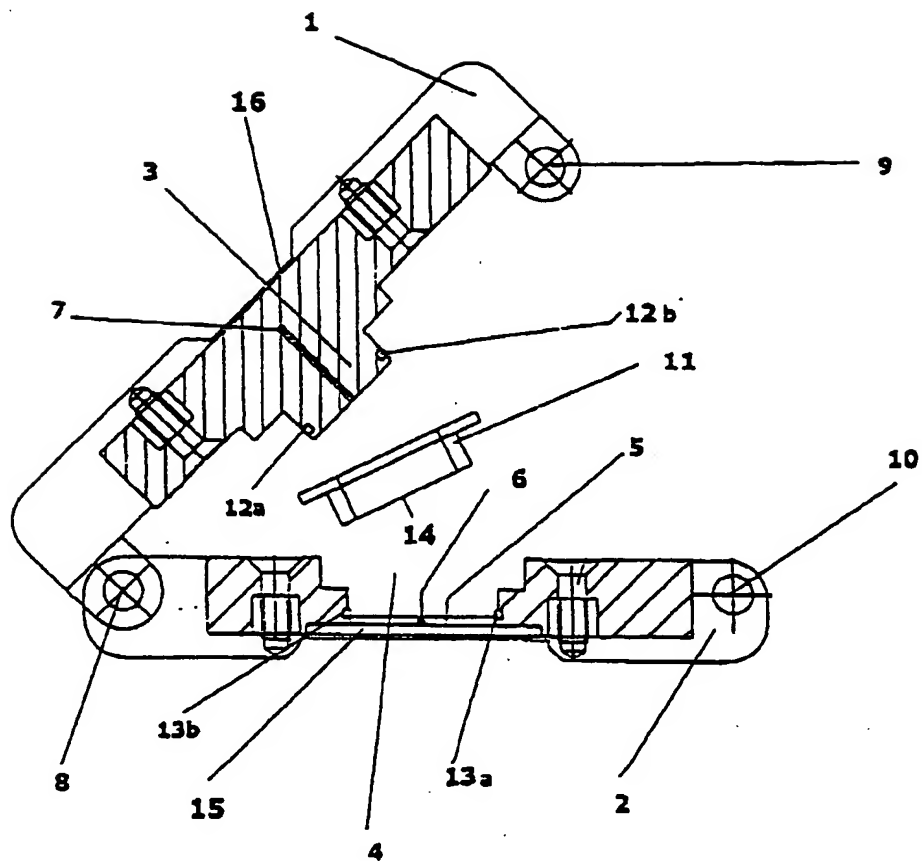
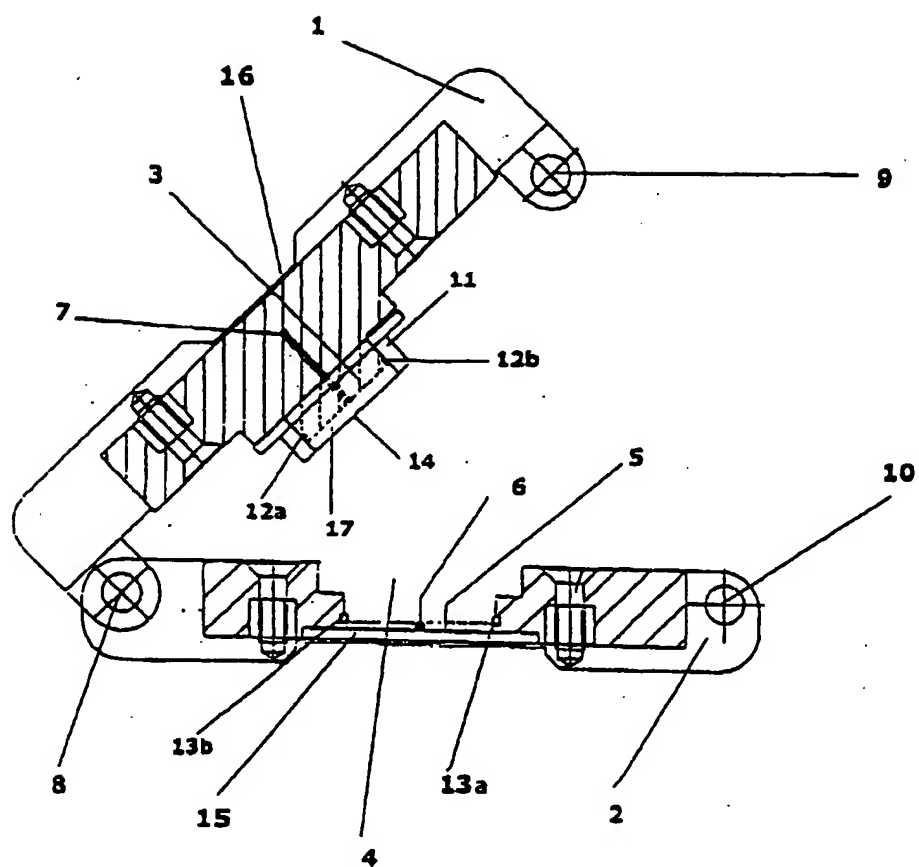
Fig. 1

Fig. 2



3/4

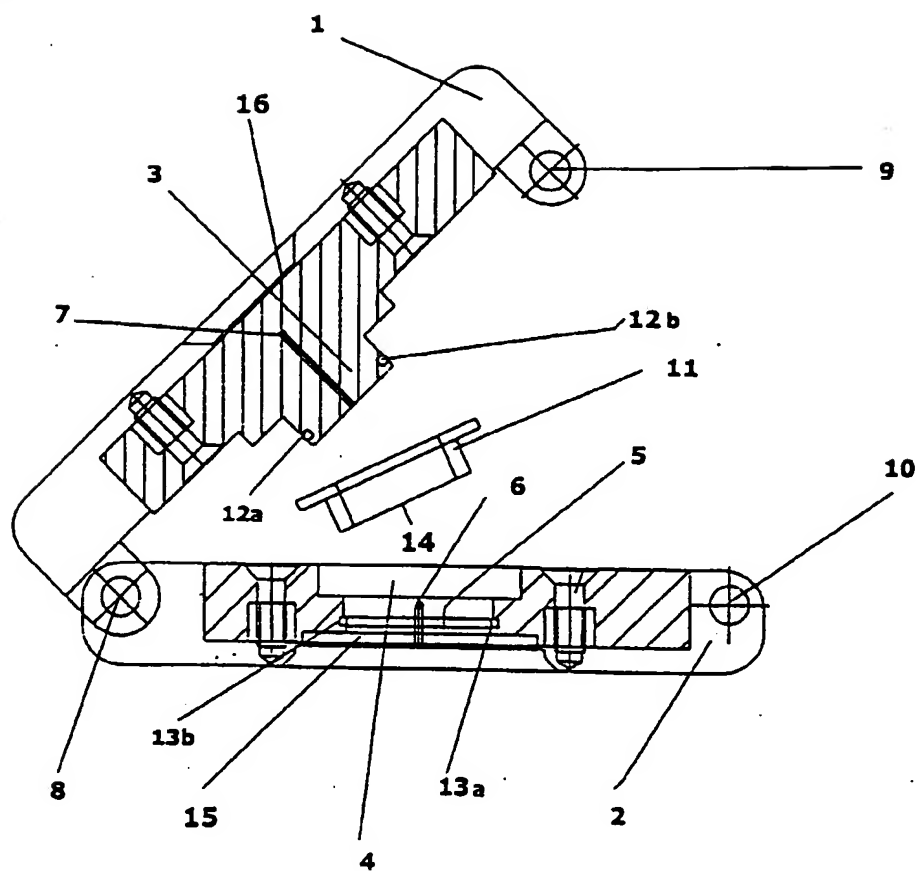
Fig. 3

Fig. 4

